



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 277 785**

② Número de solicitud: 200503203

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **21.12.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2007**

Fecha de la concesión: **21.05.2008**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2008**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2008**

⑦ Titular/es: **ORYZON GENOMICS, S.A.**  
c/ **Josep Samitier, 1-5**  
**08028 Barcelona, ES**

⑧ Inventor/es: **Buesa Arjol, Carlos;**  
**Schwartz Navarro, Simó y**  
**Arango del Corro, Diego**

⑨ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑩ Título: **Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal.**

⑪ Resumen:

Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal.

La presente invención describe un método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal basado en la variación en los niveles de expresión de genes que codifican proteínas del complejo condensina y proteínas asociadas que tiene lugar en pacientes afectados de dicha enfermedad y que pueden ser utilizadas como marcadores para el diagnóstico de dichos tumores así como en la prevención y tratamiento de los mismos.

ES 2 277 785 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método de análisis de la expresión diferencial basado en la sobreexpresión de proteínas del complejo condensina y proteínas asociadas en pacientes de cáncer colorectal que puede ser utilizado como criterio de diagnóstico de dichos tumores así como en la prevención y tratamiento de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

En términos absolutos, el cáncer es la segunda causa de muerte en España. De entre los múltiples tipos de cáncer destaca el cáncer colorectal que causó el 11% de las defunciones por cáncer en hombres y el 15% en mujeres según los datos de 1999. En España se estima que el número de casos nuevos por año se sitúa en torno a los 18.000 en ambos sexos frente a 11.300 defunciones. Los tumores de colon y recto suelen analizarse conjuntamente debido a los frecuentes errores de clasificación de los tumores de la porción recto-sigmoide. La mortalidad es muy elevada, constituyendo la segunda localización tumoral en importancia en hombres y en mujeres, con una tendencia temporal ascendente (2,2% anual en hombres y 0,7% en mujeres). En la actualidad la mortalidad es más alta en hombres, aunque en los años 60 lo era más en mujeres.

En estos tumores los datos de mortalidad no reflejan la verdadera incidencia de la enfermedad, ya que la supervivencia ha mejorado en los últimos años, principalmente en personas jóvenes. La tendencia a la estabilización de la mortalidad puede reflejar las mejoras terapéuticas obtenidas con un diagnóstico precoz, por tratarse de tumores bastante accesibles a la exploración con sigmoidoscopia y a la generalización de las colonoscopias completas en grupos de riesgo identificados.

El riesgo acumulativo durante la vida de contraer la enfermedad es del 5-6%, estando influenciado por hábitos de vida y factores hereditarios. La forma de cáncer colorectal más frecuente es el de tipo esporádico (90%) existiendo casos con componentes hereditarios: la poliposis adenomatosa familiar (0,01%) y el cáncer colorectal hereditario no-polipósico (5-10%). Estos últimos son causados por síndromes familiares definidos por unos pocos genes. Sin embargo, los genes responsables de los cánceres esporádicos permanecen sin identificar. Se considera que el desarrollo tumoral colorectal es posiblemente la consecuencia de una serie de eventos moleculares que se inician con una o varias mutaciones o eventos epigenéticos y sigue con fenómenos de progresión, en los que pueden estar involucrados factores tanto genéticos como ambientales.

En general, el cáncer colorectal no suele dar síntomas hasta fases avanzadas de crecimiento en la pared intestinal, por lo que se hace necesaria la identificación de nuevos genes y/o mutaciones responsables y/o indicadores de este tipo de cáncer y el consiguiente desarrollo de métodos analíticos que permitan un diagnóstico molecular selectivo y rápido de la enfermedad para que puedan ser incluidos en la práctica clínica habitual.

También se produciría un ahorro de costes sanitarios y una reducción en los tiempos de espera, la adopción de nuevos criterios pronósticos y de orientación terapéutica en los casos positivos así como el diseño de terapias selectivas relacionadas con estos genes.

La proteína codificada por el gen SMC2L1 (ortólogo humano de SMC2 de *S. cerevisiae*, también denominado hCAP-E) es una proteína central en los complejos de condensación y compactación cromosómica que podría tener funciones relacionadas con la regulación de la transcripción génica (Hagstrom & Meyer, 2003; Hirano, 2002; Legagneux *et al.*, 2004).

Esta proteína forma parte de una familia de proteínas denominadas SMC (por "structural maintenance of chromosomes") y que está formada por 6 proteínas numeradas de 1 a 6 (SMC1, SMC2, SMC3, SMC4, SMC5 y SMC6). Estas proteínas forman dímeros entre ellas y complejos activos con otras proteínas denominadas no-SMC (divididas en dos familias, HEAT y Kleisina). En su conjunto forman tres complejos principales: condensina (en humanos existen dos complejos diferenciados, condensina I y condensina II), cohesina y el complejo hSMC5-hSMC6, relacionado con la reparación genómica (Hagstrom & Meyer, 2003; Hirano, 2002). En las tablas 1 y 2 se describen las proteínas y los complejos que forman en distintas especies.

# ES 2 277 785 B1

TABLA 1

*Mantenimiento estructural de cromosomas*

	<b>Saccharomyces Cerevisiae</b>	<b>Schizosaccharomyces pombe</b>	<b>Caenorhabditis elegans</b>	<b>Drosophila melanogaster</b>	<b>Xenopus laevis</b>	<b>Homo sapiens</b>
5	<b>Cohesina</b>					
	SMC1	Smc1	Psm1	HIM-1	SMC1	SMC1
10	SMC3	Smc3	Psm3	SMC-3	SMC3	SMC3
	SCC1	Sccl/Mcd1	Rad21	SCC-1/COH-2	Rad21	RAD21
	SCC3	Sccl	Psc3	SCC-3	SA	SA1,SA2
15	<b>Condensina</b>					
	SMC2	Smc2	Cut14	MIX-1	SMC2	CAP-E
	SMC4	Smc4	Cut3	SMC-4	SMC4/gluon	CAP-C
20	CAP-D2	Ycs4	Cnd1	HCP-6	CG1911	CAP-D2
	CAP-G	Ycs5/Ycg1	Cnd3	-	CG17054	CAP-G
	CAP-H	Brn1	Cnd2	DPY-26	Barren	CAP-H
25	<b>reparación de DNA</b>					
	SMC5	Smc5	Spr18	C27A2.1	CG3248	SMC5
	SMC6	Smc6/Rhc18	Rad18	C23H4.6	CG5524	SMC6

(Adaptado de Hagstrom & Meyer, 2003)

TABLA 2

*Complejos de Condensina*

	Subunidades SMC		subunidades de repetición HEAT		subunidad Kleisina
40	<b>Condensina <i>S. cerevisiae</i></b>				
	Smc2	Smc4	Ycs4p	Ycs5p/Ycg1p	Brn1
	<b>Condensina <i>S. pombe</i></b>				
	Cut14	Cut3	Cnd1	Cnd3	Cnd2
45	<b>Condensina I <i>D. melanogaster</i></b>				
	SMC2	SMC4/Gluon	CG1911	CG17054	Barren
	<b>Condensina I <i>C. elegans</i></b>				
	MIX-1	DPY-27	DPY-28	?	DPY-26
50	<b>Condensina II <i>C. elegans</i></b>				
	MIX-1	SMC-4	HCP-6	?	KLE- 2/C29E4.2
	<b>Condensina I <i>X. laevis</i></b>				
	XCAP-E	XCAP-C	XCAP-D2	XCAP-G	XCAP-H
55	<b>Condensina II <i>X. laevis</i></b>				
	XCAP-E	XCAP-C	XCAP-D3	XCAP-G2	XCAP-H2
	<b>Condensina I <i>H. sapiens</i></b>				
	hCAP-E	hCAP-C	hCAP-D2	hCAP-G	hCAP-H
60	<b>Condensina II <i>H. sapiens</i></b>				
	hCAP-E	hCAP-C	hCAP-D3	hCAP-G2	hCAP-H2

SMC2L1 forma parte de los complejos de condensina I y II. Ambos complejos tienen funciones relacionadas con la compactación de cromatina (Hirano *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2003):

65 Condensina I: formada por el dímero SMC2-SMC4 (hCAP-E-hCAP-C), las subunidades HEAT hCAP-D2/CNAPI y hCAP-G, y la subunidad Kleisina hCAP-H. El dímero hCAP-E-hCAP-C se encuentra en el citoplasma en células interfásicas (fuera de mitosis). Una vez llegada la mitosis, las subunidades no-SMC se fosforilan, interaccionan con el

dímero hCAP-E-hCAP-C, forman el complejo y se trasladan al núcleo donde interaccionan con el DNA y lo compactan (Hagstrom & Meyer, 2003).

5 Condensina II: formada por el dímero SMC2-SMC4 (hCAP-E-hCAP-C), las subunidades HEAT hCAP-D3 y hCAP-G2, y la subunidad Kleisina hCAP-H2. Parece ser que el complejo se encuentra en el núcleo en células interfásicas (fuera de mitosis) (Fig. 1A) y podría tener relación con la regulación transcripcional génica, ayudando a compactar la zona promotora de determinados genes. Esto situaría la condensina en zonas de eucromatina y asociadas a regiones transcripcionalmente activas (las zonas donde existe regulación transcripcional, es decir, activación o inhibición de la transcripción), como son las equivalentes a la zona interna nuclear (Fig. 1A y 1B) y a las bandas R de los cromosomas, con otros factores reguladores como histonas acetiladas (por ejemplo la histona H3 acetilada en la lisina K3) (Fig. 2 y 3).

15 No existen evidencias en la literatura que hayan relacionado estas proteínas con este tipo de cáncer. Sin embargo, la posible relación de la condensina con el silenciamiento transcripcional y la correcta compactación cromosómica hace pensar que podría estar alterada en cáncer. La mayoría de cánceres presentan hipometilación general del genoma acompañada de una hiperacetilación general. No obstante, se ha demostrado que determinadas zonas promotoras génicas ricas en islas CpG tiene hipermetilación y los genes están silenciados (no se transcriben). En la presente invención se describe que la condensina colabora en estos procesos de silenciamiento y que las proteínas que forman estos complejos y proteínas asociadas están sobreexpresadas. Asimismo, dado que se considera que la mayoría de alteraciones epigenéticas son muy iniciales en los procesos neoplásicos, esta sobreexpresión también puede ser característica de procesos incipientes como los adenomas.

### Descripción de la invención

25 La presente invención tiene por objeto un método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal que comprende detectar en una muestra biológica aislada de un paciente una variación en los niveles de expresión de uno o más genes que codifican proteínas que forman parte del complejo condensina u otras proteínas que interaccionan con dicho complejo, donde dicha variación en los niveles de expresión del gen se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer colorectal o de una condición pre-maligna del mismo.

30 En particular, el gen o genes a analizar se seleccionan entre el grupo formado por hCap-E, hCap-C, hCap-D2, hCap-D3, hCap-G, hCap-G2, hCap-H, y KIF4A y la variación en los niveles de expresión del gen o genes es un incremento en los niveles de expresión.

35 En particular, dicha muestra puede ser DNA o RNA y puede aislarse a partir de células obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción.

40 En una realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante una amplificación por PCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos.

En otra realización de la invención, la detección se puede llevar a cabo mediante biochips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo o por biochips de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.

45 En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje.

En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante geles de electroforesis. Opcionalmente, la detección se puede llevar a cabo mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica.

50 En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

55 En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen mediante la utilización de nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

Opcionalmente, la muestra analizada puede ser la proteína codificada por el gen o fragmentos de la misma.

60 En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante incubación con un anticuerpo específico. Opcionalmente, la detección se puede llevar a cabo mediante Western blot o mediante inmunohistoquímica.

En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante geles de electroforesis de proteína.

65 En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante chips de proteína.

En otra realización de la invención, la detección se lleva a cabo mediante ELISA o cualquier otro método enzimático.

## ES 2 277 785 B1

La presente invención también tiene por objeto un método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal donde la variación en los niveles de expresión de uno o más de los genes descritos se utiliza como pronóstico de la progresión del cáncer colorectal o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

5

La presente invención también tiene por objeto un kit para llevar a cabo el método de análisis de expresión diferencial que comprende los reactivos y aditivos apropiados para detectar la variación en los niveles de expresión del gen o genes.

10

La presente invención tiene también por objeto adicional un método de análisis de compuestos con potencialidad terapéutica en cáncer colorectal que comprende determinar la capacidad de dichos compuestos de disminuir los niveles de expresión de uno o más de los genes descritos donde los compuestos son compuestos obtenidos de la información de la secuencia tales como oligonucleótidos antisentido o de interferencia de RNA u otros basados en la desestabilización y eliminación del mRNA o el impedimento de su traducción a proteína.

15

La presente invención tiene también por objeto adicional un método de análisis de compuestos con potencialidad terapéutica en cáncer colorectal que comprende determinar la capacidad de dichos compuestos de contrarrestar la variación en los niveles de expresión de uno o más de los genes descritos donde los compuestos son nanopartículas paramagnéticas o nanopartículas de excitación térmica.

20

La presente invención tiene también por objeto adicional un método de análisis de compuestos con potencialidad terapéutica en cáncer colorectal que comprende determinar la capacidad de dichos compuestos de contrarrestar la variación en los niveles de expresión de uno o más de los genes descritos donde los compuestos son nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos específicos y compuestos tóxicos vehiculados de forma simple, binaria o modular para la célula maligna.

25

Asimismo, la presente invención tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de compuestos con potencialidad terapéutica obtenidos según los métodos descritos anteriormente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

30

Por otra parte, la presente invención también tiene por objeto el uso de compuestos con potencialidad terapéutica obtenidos según los métodos descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer colorectal o de una condición pre-maligna del mismo.

35

La presente invención se basa en la sobreexpresión de las proteínas del complejo condensina y proteínas asociadas observada en pacientes afectados de cáncer colorectal. Los datos demostraban una sobreexpresión de hCAP-E en el análisis por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-hCAP-E en muestras de cáncer colorectal en comparación con muestras de tejido normal, de manera independiente de su estadiaje tumoral y con una incidencia de sobreexpresión del 90% de los tumores (18/20) (Fig. 4). Esta sobreexpresión también se observó en todos los análisis por inmunohistoquímica en tejidos tumorales de cáncer colorectal (Fig. 5).

40

Asimismo, se observó que la expresión de hCAP-E es también específica de las células pluripotenciales (stem) de la cripta del colon (Fig. 6), que son las células indiferenciadas a partir de las cuales se originan los tumores colorectales. Su patrón de expresión indica que ésta prácticamente desaparece conforme la célula pluripotencial se transforma en célula epitelial (célula Globbet) en una cripta normal para formar el epitelio, por lo que podría considerarse como un marcador de diferenciación celular.

45

En la Tabla 3 se muestran los niveles de sobreexpresión de hCAP-E en cáncer colorectal de acuerdo con el estadiaje.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

TABLA 3

*Sobreexpresión de hCAP-E en cáncer colorectal de acuerdo con el estadiaje*

CASO	ESTADIO	hCAP-E
94T	I	+
78T	II	+
100T	II	+
67T	II	+
85T	II	+
60T	III	+
162T	III	+
141T	III	+
38T	III	+
55T	III	+
66T	III	-
88T	III	+
91T	III	+
213T	IV	=
129T	IV	+
35T	IV	+
31T	IV	+
36T	IV	+
86T	IV	+
137T	IV	+

La incidencia de sobreexpresión (+) fue del 90% (18 sobre 20 tumores). Solamente se observó un caso en el que la expresión era inferior al normal (-) y un caso en el que el tejido normal y el tejido tumoral mostraban niveles similares de expresión (=).

Asimismo, se analizaron mediante PCR en tiempo real (real-time PCR) los niveles de expresión de otras proteínas que forman el complejo condensina, tales como hCap-C, hCap-D2, hCap-D3, hCap-G, hCap-G2 y hCap-H así como de otras proteínas asociadas que interactúan con el complejo, como KIF4A, en algunos casos tumorales en los que se había observado la sobreexpresión de hCap-E. Los resultados indicaron que todas las proteínas analizadas presentaban un incremento en los niveles de expresión en tejido tumoral en relación con los niveles en tejido normal (Fig. 7). Por lo tanto, se puede concluir que todas las proteínas que integran el complejo condensina y otras proteínas que interactúan con dicho complejo están sobreexpresadas en los tumores.

Así pues, las proteínas que forman el complejo condensina y otras proteínas asociadas que interactúan con el mismo pueden ser utilizadas como marcadores de cáncer colorectal o de una condición pre-maligna del mismo teniendo potencial como marcador de diagnóstico y/o de recomendación para la colonoscopia.

Asimismo, estas proteínas pueden ser marcadores de células pluripotenciales (stem cells) de la cripta del colon como marcadores de diferenciación celular. Por otra parte, estas proteínas pueden ser marcadores histológicos de cáncer y/o pueden tener utilidad en sistemas de análisis por imagen.

Además, estas proteínas pueden constituir dianas terapéuticas directas o indirectas, permitiendo la llegada de tratamientos antitumorales vehiculizados al tumor a través de interacciones con cualquiera de estas proteínas o mediante la modulación de sus niveles de expresión.

Cabe destacar que recientemente se ha descrito que los niveles de expresión de las proteínas del complejo condensina no varían a lo largo de ciclo celular y, por lo tanto, no varían durante la mitosis (Takemoto *et al.*, 2004). Así pues, el hecho de encontrar niveles elevados de estas proteínas en células cancerosas tal como se describe en la presente invención no puede ser atribuido simplemente a un aumento de la actividad replicativa (mitosis) de la célula tumoral, sino que se trata de una sobreexpresión relativa real debida al desarrollo de la enfermedad.

Por lo tanto, la presente invención demuestra una asociación total entre los niveles de expresión de las proteínas que integran el complejo condensina y otras proteínas asociadas a dicho complejo y la presencia de cáncer colorectal cualquiera que sea su estadio de desarrollo, lo que supone disponer de una nueva herramienta molecular que permite el diagnóstico de la enfermedad incluso en sus estadios más iniciales, lo cual no es posible con los métodos actuales.

## Bibliografía

- Hagstrom K, Meyer BJ. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat Rev Genet* 2003 July 4:520-534.

- Hirano T. The ABC of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion and repair. *Genes & Development*, 2002 16:399-341.

- Legagneux V, Cubizolles F, Watrin E. Multiple roles of condensins: a complex story. *Biology of the Cell*, 2004 96:201-213.

- Hirano T, Mitchison TJ. A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation *in vitro*. *Cell* 1994 Nov 4;79(3):449-58.

- Ono T, Fang Y, Spector DL, Hirano T. Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell*. 2004 Jul; 15(7):3296-308.

- Ono T, Losada A, Hirano M, Myers MP, Neuwald AF, Hirano T. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*. 2003 Oct 3; 115(1):109-21.

- Takemoto A, Kimura K, Yokoyama S, Hanaoka F. Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6; 279(6):4551-9.

## Breve descripción de las figuras

La figura 1A indica la localización de hCAP-E en células interfásicas, representado por los cúmulos blanquecinos. La figura 1B representa la imagen de un núcleo celular obtenida por microscopía electrónica. En ella pueden observarse separadas la heterocromatina y la eucromatina

La figura 2 representa la colocalización de hCAP-E en las regiones cromosómicas equivalentes a la eucromatina (bandas R). Se representa el mismo cromosoma teñido con hCAP-E y por bandas G. La heterocromatina se identifica por las zonas más oscuras, en cada una de las figuras la derecha.

La figura 3 indica la colocalización de hCAP-E con histona 4 acetilada (H4Ac) y las bandas R en cromosomas metafásicos (bandas claras en el cromosoma).

La figura 4 representa los resultados del análisis por Western blot de hCAP-E en muestras normales (N) y tumorales (T) de cáncer colorectal. La actina se utilizó como control de carga.

La figura 5 corresponde a un análisis por inmunohistoquímica de tejido colorectal utilizando un anticuerpo específico anti-hCAP-E. Se observa la zona correspondiente a la cripta normal (N) y la zona correspondiente al adenocarcinoma de colon (T) que presenta una mayor expresión de hCAP-E.

La figura 6 corresponde a un análisis por inmunohistoquímica en criptas normales de colon utilizando un anticuerpo específico anti-hCAP-E, en la que se observa que las células pluripotenciales (stem) presentan una tinción específica más fuerte para hCAP-E que las células Globbet.

La figura 7 representa los resultados del análisis por PCR a tiempo real de otras proteínas del complejo condensina y de la proteína asociada KIF4A. La muestra analizada fue la muestra 67T en la que se había observado previamente una sobreexpresión de hCAP-E en comparación con su muestra normal correspondiente. El análisis se hizo por triplicado y se utilizó el ribosomal 18S como control interno.

## Descripción de una realización preferente

A continuación se describe una realización preferente, aunque no limitativa, de la invención.

### Muestras de pacientes

Se obtuvieron biopsias de tejido normal y tumoral de 20 pacientes diagnosticados con cáncer colorectal. Las muestras obtenidas quirúrgicamente fueron congeladas de inmediato en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C para la posterior extracción de proteínas y RNA. Además, se realizaron cortes histológicos para realizar pruebas de inmunohistoquímica. Se registraron las características clínico-patológicas incluyendo el estadio y grado de diferenciación de los tumores así como de un seguimiento de al menos tres años para detectar los casos con recidiva temprana.

## ES 2 277 785 B1

### *Análisis de los niveles de expresión de hCAP-E*

*Western blot:* Las proteínas fueron extraídas a partir de las muestras de tejido normal y colorectal mediante métodos estándar, utilizando tampón de tisis RIPA. Noventa  $\mu\text{g}$  de proteína fueron fraccionados en un gel SDS-PAGE al 10%, transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, USA), bloqueadas con 5% leche en TBS-T, e hibridadas con un anticuerpo primario anti-hCAP-E (Abcam, UK) diluido 1:2500 en solución de bloqueo, y luego con un anticuerpo secundario anti-conejo (Dako Cytomation, Denmark) diluido 1:500. La señal quimioluminescente fue detectada utilizando el kit ECL (Amersham, USA) y se compararon los niveles de expresión de las muestras tumorales con su contraparte normal. Finalmente, la membrana fue rehibridada con anticuerpo anti-actina (Invitrogen, USA) que fue utilizada como control de carga. Como se observa en la figura 4, todas las muestras tumorales presentaban un incremento en los niveles de expresión de hCAP-E.

*Inmunohistoquímica:* Los cortes histológicos correspondientes a los tejidos de pacientes con cáncer colorectal fueron desparafinados con xileno y rehidratados en series decrecientes de etanol y agua destilada. Las secciones fueron tratadas con tampón citrato pH 6 (5 min 800 W y 10 min 450 W, al microondas), la peroxidasa endógena fue bloqueada con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y luego fueron hibridadas con el anticuerpo primario anti-hCAP-E (Abcam, UK). Para el análisis inmunohistoquímico se empleó el kit EnVision + Dual Link System (Dako Cytomation, Denmark) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se comparó el nivel de expresión de hCAP-E entre zonas de tejido normal y tumoral. En la figura 5 se observa una mayor expresión de hCAP-E en tejido tumoral respecto al tejido control.

### *Análisis de los niveles de expresión de otras proteínas del complejo condensina y proteínas asociadas*

*Real-time PCR:* Los niveles de mRNA correspondientes a otras proteínas del complejo condensina y proteínas asociadas fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real (real-time PCR), para lo cual el RNA fue extraído a partir de las muestras de tejido normal y colorectal mantenidas a  $-80^\circ\text{C}$ , utilizando Trizol (Invitrogen, USA). Diez  $\mu\text{g}$  de RNA fueron retrotranscritos empleando el kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, USA) y amplificados con TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) para hCAP-C, hCAP-D2, hCAP-D3, hCAP-G, hCAP-G2, hCAP-H y KIF4A, respectivamente. La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix en el equipo 7500 Real Time PCR system (ambos de Applied Biosystems, USA). Los niveles relativos de mRNA de cada gen fueron cuantificados empleando el método  $\Delta\Delta\text{C}_T$ , con el programa asociado al sistema. Se realizó el ensayo por triplicado y se utilizó 18S rRNA como control endógeno, y se comparó la expresión entre tejido normal y tumoral del mismo paciente. Como se observa en la figura 7, las muestras tumorales presentaban unos niveles de mRNA muy incrementados respecto a las muestras control para todos los genes analizados.



REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal **caracterizado** porque comprende detectar en una muestra biológica aislada de un paciente un incremento en los niveles de expresión de uno o más genes que codifican proteínas que forman parte del complejo condensina u otras proteínas que interactúan con dicho complejo, seleccionados entre el grupo formado por hCap-E, hCap-C, hCap-D2, hCap-D3, hCap-G, hCap-G2, hCap-H, y KIF4A, donde dicho incremento en los niveles de expresión del gen se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer colorectal o de una condición pre-maligna del mismo.
- 10 2. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra es aislada de células obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción.
- 15 3. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque la muestra a analizar es DNA.
- 20 4. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque la muestra a analizar es RNA.
- 25 5. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se realiza mediante una amplificación por PCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos.
- 30 6. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo por chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo.
- 35 7. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo por chips de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.
- 40 8. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje.
- 45 9. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante geles de electroforesis.
- 50 10. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica.
- 55 11. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.
- 60 12. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen mediante la utilización de nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.
- 65 13. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la muestra analizada es la proteína codificada por el gen o fragmentos de la misma.
14. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante incubación con un anticuerpo específico.
15. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante Western blot.
16. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica.
17. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante geles de electroforesis.
18. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante chips de proteína.

## ES 2 277 785 B1

19. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante ELISA o cualquier otro método enzimático.

5 20. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

10 21. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen mediante la utilización de nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

15 22. Método de análisis de expresión diferencial en cáncer colorectal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el incremento en los niveles de expresión del gen o genes se utiliza como pronóstico de la progresión del cáncer colorectal o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

20 23. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 que comprende los reactivos y aditivos apropiados para detectar el incremento en los niveles de expresión del gen o genes.

20

25

30

35

40

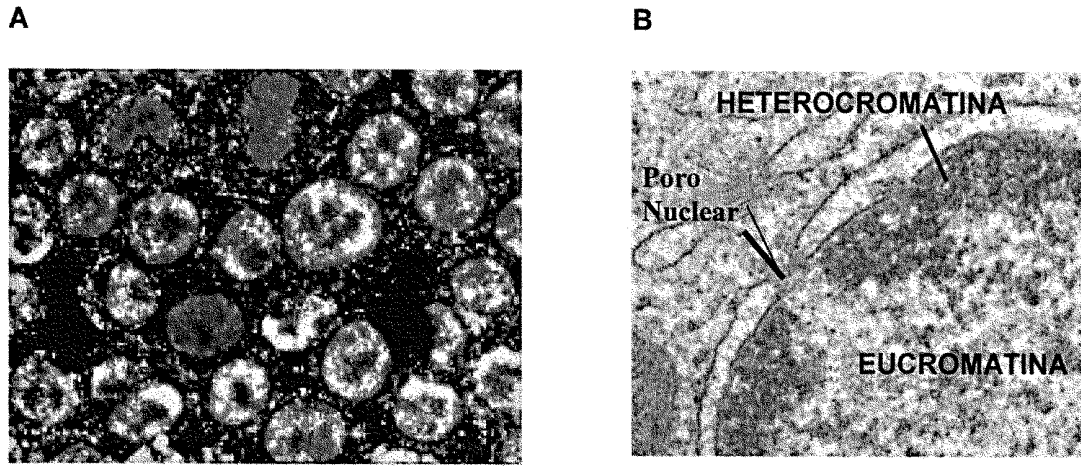
45

50

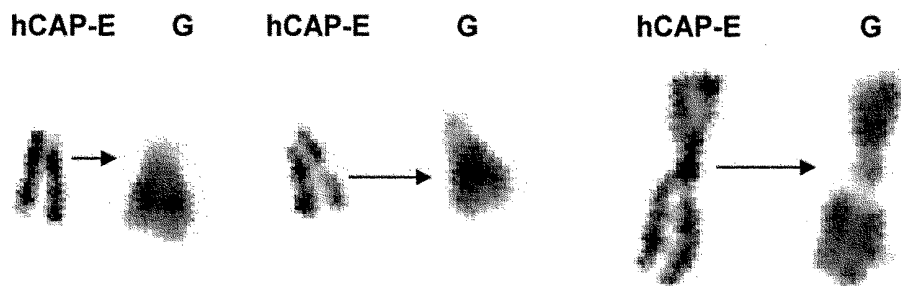
55

60

65



**Fig. 1**



**Fig. 2**

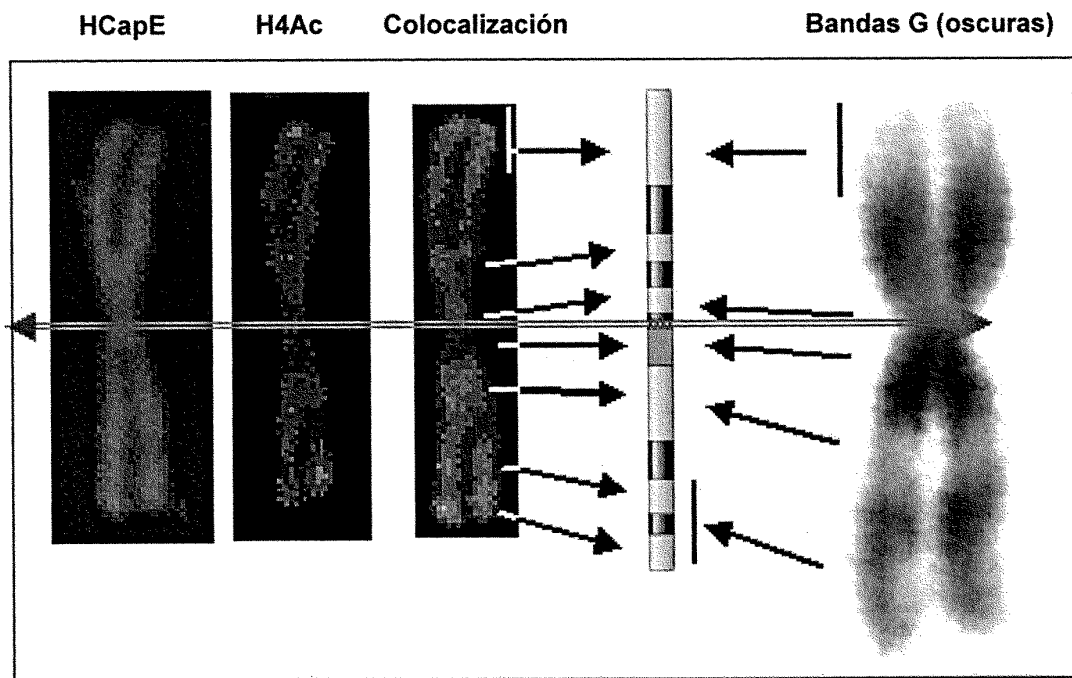


Fig. 3

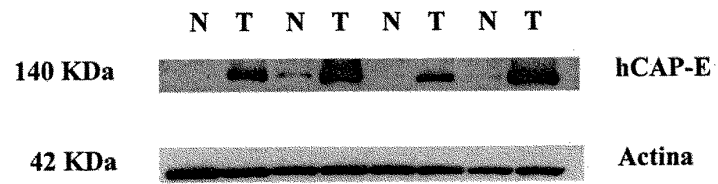
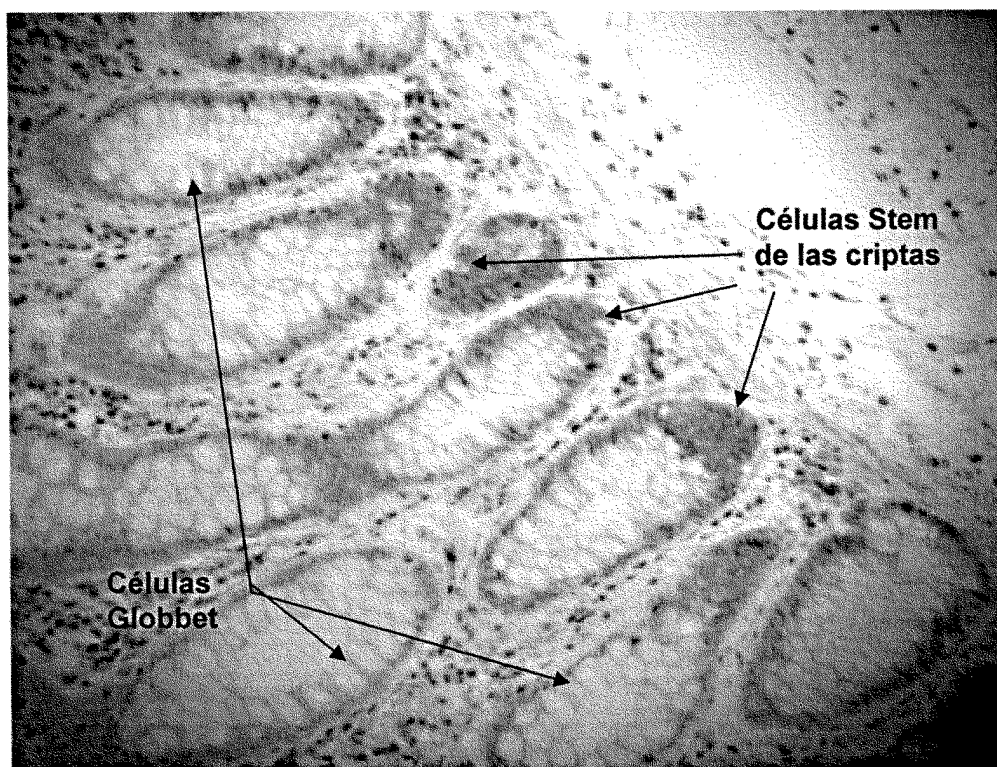


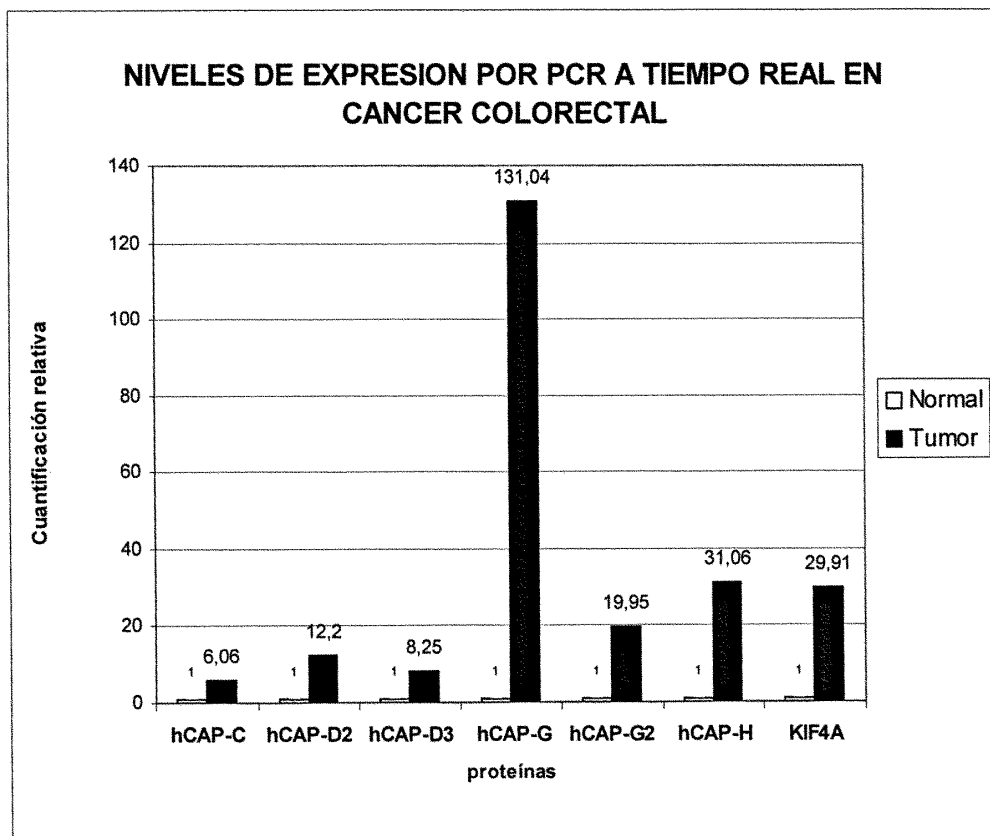
Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 277 785

② Nº de solicitud: 200503203

③ Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HAMADA, K., et al. "Increase expression of the genes for mitotic spindle assembly and chromosome segregation in both lung and pancreatic carcinomas". Cancer Genomics an Proteomics. 2004, vol 1, páginas 231-240. Ver todo el documento.	
A	JÄGER, D., et al. "Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chorosome condensatin protein from a melanoma complementary DNA library". Cancer Res. 1 Julio 2000, vol 60, páginas 3584-3591. Ver todo el documento, especialmente resumen; páginas 3587,3588,3590.	
A	GHISELLI, G. et al. "The cohesin SMC3 is a target for the eta-catenin/TCF4 transactivation pathway". J. Biol. Chem. 30 Mayo 2003, vol 278, nº 22, páginas 20259-20267. Ver todo el documento, especialmente resumen; procedimientos experimentales y discusión.	
A	WO 2004041076 A2 (PROTEIN DESING LABS, INC., HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE) 21.05.2004. Ver todo el documento, especialmente resumen; párrafos [4-5,9,12,41-49,53,56,57,104,113,114,116-143]; reivindicaciones.	
A	WO 2004074436 A2 (INCYTE CORPORATION) 02.09.2004. Ver todo el documento, especialmente resumen; página 2, línea 25 - página 3, línea 15; página 12, línea 10 - página 14, línea 23; página 23, línea 30 - página 26, línea 17; página 39, línea 25 - página 40, línea 4; página 48, línea 18 - página 49, línea 5; reivindicaciones 1-6.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.06.2007

Examinador  
B. Pérez Esteban

Página  
1/2





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 277 785

② Nº de solicitud: 200503203

③ Fecha de presentación de la solicitud: **21.12.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004090550 A2 (COLOTECH A/S) 21.10.2004, Ver todo el documento, especialmente resumen; reivindicaciones 7-12,15-17.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.06.2007

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/2